

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/006243

International filing date: 31 March 2005 (31.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-106105  
Filing date: 31 March 2004 (31.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 02 June 2005 (02.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

13.5.2005

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 3 1 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 1 0 6 1 0 5

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号

The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

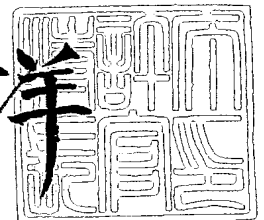
J P 2 0 0 4 - 1 0 6 1 0 5

出 願 人  
Applicant(s): カルピス株式会社

2 0 0 5 年 4 月 6 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川 洋



出証番号 出証特 2 0 0 5 - 3 0 3 0 5 3 1

【書類名】 特許願  
【整理番号】 P04-147  
【提出日】 平成16年 3月31日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【発明者】  
    【住所又は居所】 岡山県岡山市津島中 1 - 3   R A 3 0 6  
    【氏名】 森山 芳則  
【発明者】  
    【住所又は居所】 岡山県岡山市津島南二丁目 6 - 2 2  
    【氏名】 坪井 誠二  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県相模原市淵野辺 5 - 1 1 - 1 0   カルピス株式会社 基  
    礎研究フロンティアラボラトリー内  
    【氏名】 増山 明弘  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県相模原市淵野辺 5 - 1 1 - 1 0   カルピス株式会社 基  
    礎研究フロンティアラボラトリー内  
    【氏名】 高野 俊明  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県相模原市淵野辺 5 - 1 1 - 1 0   カルピス株式会社 基  
    礎研究フロンティアラボラトリー内  
    【氏名】 中村 哲平  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000104353  
    【氏名又は名称】 カルピス株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100081514  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 酒井 一  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100082692  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 蔵合 正博  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 007010  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 0014648

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

ホエーを有効成分として含む肝障害予防又は抑制剤。

**【請求項 2】**

ホエーが、酸性ホエー及び／又はチーズホエーである請求項 1 記載の肝障害予防又は抑制剤。

**【請求項 3】**

酸性ホエーが、乳を乳酸菌を含む菌株により発酵させて得られる発酵ホエーを含むことを特徴とする請求項 2 記載の肝障害予防又は抑制剤。

**【請求項 4】**

乳酸菌が、ラクトバチルス属 (*Lactobacillus* sp.) 乳酸菌であることを特徴とする請求項 3 記載の肝障害予防又は抑制剤。

**【請求項 5】**

ラクトバチルス属乳酸菌が、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) であることを特徴とする請求項 4 記載の肝障害予防又は抑制剤。

**【請求項 6】**

ラクトバチルス・ヘルベティカスが、ラクトバチルス・ヘルベティカス CM 4 株 (経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所 特許生物寄託センター寄託番号：F E R M B P - 6 0 6 0) であることを特徴とする請求項 5 記載の肝障害予防又は抑制剤。

**【請求項 7】**

酸性ホエーが、乳に酸を加えて得られる水分画分を含むカゼインホエーであることを特徴とする請求項 2 記載の肝障害予防又は抑制剤。

**【請求項 8】**

請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項記載の肝障害予防又は抑制剤を含むことを特徴とする肝障害予防又は抑制用機能性食品。

**【請求項 9】**

ホエー以外の乳成分を更に含む請求項 8 記載の機能性食品。

【書類名】明細書

【発明の名称】肝障害予防又は抑制剤及び肝障害予防又は抑制用機能性食品

【技術分野】

【0001】

本発明は、肝障害予防又は抑制剤及び肝障害予防又は抑制用の特定保健用食品等の機能性食品に関し、更に詳細には、肝細胞壊死に起因する血清中のGOT値やGPT値の上昇を抑制し、肝障害を予防及び／又は抑制するための肝障害予防又は抑制剤及び肝障害予防又は抑制用機能性食品に関する。

【背景技術】

【0002】

肝臓は、代謝の中樞器官であり、胆汁産生、排泄、解毒等の多彩且つ重要な機能を有している。一方、予備力が強い沈黙の臓器とも言われており、倦怠感や黄疸、浮腫、腹水等の症状が表れ難く、その障害の発見が遅れがちになり易い。一般には、GOT(グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミラーゼ)やGPT(グルタミン酸-ピルビン酸トランスアミラーゼ)は、肝臓に多く存在することが知られており、血中のGOT値及びGPT値が肝臓細胞壊死の程度を鋭敏に反映することから、肝障害の簡易な測定法としてこれらの値による評価がなされることが多い。

近年、食生活の欧米化、栄養バランスの偏り、アルコール摂取や薬物による肝臓への負担が増加しており、脂肪肝の患者数も大幅に増加している。また慢性肝疾患は、肝細胞の年余にわたる破壊と再生の繰返しにより、肝組織の繊維化が進行し、肝硬変、肝細胞ガンへと進行する疾患であり、このような患者が増加している。

現在、肝疾患に対する特効薬はなく、食事療法や安静を中心とする治療が主流であるが、例えば、慢性肝疾患に対して、強力ネオミノファーゲンC(登録商標、ミノファーゲン社製)等のグリチルリチン製剤が使用されることがある。しかし、グリチルリチン製剤は、腸内で不活性化されるために、経口での効果は期待できず、主に注射剤として使用されている。従って、日常的な注射の苦痛が生じ、更には、副作用として高血圧や低カリウム血症等が生じることも報告されている。

一方、種々のアミノ酸製剤が、肝硬変、肝不全等の肝疾患に伴う肝性脳症や低アルブミン血症の改善等を目的として使用されることがある。しかし、該アミノ酸製剤は、肝疾患を治療するというより、肝疾患による栄養障害の改善、即ち、血漿アミノ酸の不均衡是正による窒素代謝の改善や血中アンモニア値の低下等を期待して使用されているに過ぎない。

【0003】

ところで、最近、ラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトフェリンを有効成分とする肝機能改善剤が提案されている(特許文献1参照)。該ラクトフェリンは、多くの哺乳動物の乳に含まれることが知られている。

しかし、ラクトフェリンは熱により変性し易く、通常の高温加熱殺菌処理等を行なうことで、容易に変性することが知られている(例えば、非特許文献1～3参照)。このため、工業的な分離や利用には制限があり、コストや汎用性の点で問題がある。

近年、ホエーには、胃粘膜保護成分( $\alpha$ -ラクトアルブミン)等様々な生理機能成分を含むことが知られているが、通常の高熱殺菌処理された乳又はホエーにおいて、肝機能改善作用は報告されていない。

【特許文献1】特開2001-226289号公報

【非特許文献1】食品新素材有効利用技術シリーズ「ラクトフェリン」(平成12年3月発行、社団法人菓子総合技術センター)

【非特許文献2】乳業技術Vol.51.2001「ミルクのラクトフェリン」

【非特許文献3】Journal of Dairy Science Vol.74, No.1, p65-71, 1991

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の課題は、日常的に連用可能で、安全性に優れ、肝細胞壊死等の肝障害を有効に予防及び／又は抑制しうる肝障害予防又は抑制剤及び、該剤を含む肝障害予防又は抑制用の特定保健用食品等の機能性食品を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

すなわち、本発明によれば、ホエーを有効成分として含む肝障害予防又は抑制剤が提供される。

また本発明によれば、前記肝障害予防又は抑制剤を含むことを特徴とする肝障害予防又は抑制用機能性食品が提供される。

【発明の効果】

【0006】

本発明の肝障害予防又は抑制剤は、食経験のあるホエーを有効成分とするので、日常的に連用可能で、安全性に優れ、肝細胞壊死等の肝障害を有効に予防及び／又は抑制することができる。また、本発明の肝障害予防又は抑制用機能性食品は、前記本発明の肝障害予防又は抑制剤を含むので、肝障害に対する予防及び／又は抑制が期待できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

以下、本発明につき更に詳細に説明する。

本発明の肝障害予防又は抑制剤は、有効成分としてホエーを含み、例えば、肝細胞壊死が主の要因とされる血中のGOT値及びGPT値の上昇を有効に予防及び／又は抑制することができる。

前記有効成分としてのホエーは、乳から、カゼインタンパク質等を常法に従って全部若しくは大部分除去して得られる水分画分を含むものであって、酸性ホエー及び／又はチーズホエー等が挙げられる。酸性ホエーとしては、乳酸菌を利用して発酵により得られる発酵ホエー、乳に酸を加えてカゼインタンパク質等を常法に従って全部若しくは大部分を除去して得られる水分画分を含むカゼインホエー等が挙げられ、特に、肝障害に対する予防及び／又は抑制効果に優れる点で発酵ホエーを含むことが好ましい。

【0008】

前記発酵ホエーは、通常、乳を乳酸菌で発酵、または乳酸菌と酵母で共生発酵する方法により得られる発酵ホエー等が挙げられる。原料の乳としては、例えば、牛乳、山羊乳、羊乳等の獣乳；豆乳等の植物乳；これらの加工乳である脱脂乳、還元乳、粉乳、コンデンスミルク等が挙げられる。使用に際しては混合物として用いることができる。

乳の固形分濃度は特に限定されないが、例えば、脱脂乳を用いる場合の無脂乳固形分濃度は、9質量％程度が最も良く用いられる。しかし、設備あたりの生産量を考慮した場合、無脂乳固形分濃度をある程度高くすることも可能である。発酵乳生産時に得られる発酵ホエーは、他の乳成分と分離して使用できる他、後述する機能性食品等とする場合には、必ずしも他の乳成分を分離する必要はない。

【0009】

前記乳酸菌としては、ストレプトコッカス属、ラクトコッカス属、ラクトバチルス属、ビフィドバクテリウム属等に属する乳酸菌が挙げられるが、ラクトバチルス属が好ましい。具体的には、例えば、ラクトバチルス・ブルガリカス(*Lactobacillus bulgaricus*)、ラクトバチルス・ヘルベティカス(*Lactobacillus helveticus*)、ラクトバチルス・カゼイ(*Lactobacillus casei*)、ラクトバチルス・アシドフィラス(*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・ファーマンタム(*Lactobacillus fermentum*)等が挙げられ、特に、ラクトバチルス・ヘルベティカスが好適に使用できる。更に具体的には、ラクトバチルス・ヘルベティカスATCC 15009、ラクトバチルス・ヘルベティカスATCC 521、ラクトバチルス・ヘルベティカスCM4株(経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所 特許生物寄託センター 寄託番号:FERM BP-6060, 寄託日1997. 8. 15)(以下、CM4株と称す)が挙げられ、特にCM4株が好適である。このCM4株は、特許手続上の微生物寄託の国際的承認に関するブタペスト条約に上記寄託番号で登録されており

、この株が特許されることにより、第三者が入手できない制限が全て取り除かれる。

#### 【0010】

前記乳酸菌は、あらかじめ前培養しておいた十分に活性の高いスターターとして用いることが好ましい。初発菌数は、好ましくは $10^5 \sim 10^7$ 個/ml程度である。

前記発酵ホエーを、特定保健用食品等の機能性食品として利用する場合に、風味を良好にし、嗜好性を良好とするために、前記発酵時に酵母を併用することができる。酵母の菌種は特に限定されないが、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)等のサッカロマイセス属酵母等が好ましく挙げられる。酵母の含有割合は、その目的に応じて適宜選択することができる。

#### 【0011】

発酵方法としては、前記乳酸菌の1種もしくは2種以上を培地に培養するか、または前記乳酸菌の1種もしくは2種以上と前記酵母の1種もしくは2種以上とを混合して培地に培養することができる。培地としては、前記乳成分の1種もしくは2種以上のみからなる培地、またはこれらに副次的成分として酵母エキス、アスコルビン酸等のビタミン類、システイン等のアミノ酸、塩化ナトリウム等の塩類、グルコース、シュクロース、ラフィノース、スタキオース等の糖類、ゼラチン等の安定剤、フレーバー等を適宜添加した培地を用いることができる。

発酵は、通常静置若しくは攪拌培養により、例えば、発酵温度 $20 \sim 50^\circ\text{C}$ 、好ましくは $30 \sim 45^\circ\text{C}$ 、発酵初発pH $6.0 \sim 7.0$ の条件等で行い、菌数が $10^7$ 個/ml以上、pH $5.0$ 以下になった時点で培養を停止する方法等により行なうことができる。また、発酵前の乳は、高温加熱殺菌等が施されていても良い。

得られる発酵ホエーは、通常分離操作によりカードから分離して得ることができる。また、有効成分としての発酵ホエーを後述する機能性食品に用いる場合には、必要に応じて発酵ホエーを分離せずに該ホエーを含む発酵乳をそのまま用いることができる他、分離操作の程度を適宜決定することができる。

#### 【0012】

前記カゼインホエーは、前記全乳又は脱脂乳等の固形物の場合には蒸留水に溶解した乳に、例えば、乳酸、クエン酸、酢酸、酒石酸、フマル酸、リンゴ酸、グルコン酸、アジピン酸等を加えて、主にカゼイン等のタンパク質を除去しうる酸度に調整した後、膜処理等の常法に従ってホエー分(水分画分)を分離することにより得られる。この際、酸を加える前の乳は、高温加熱殺菌等が施されていても良い。また、酸の混合割合は、酸の種類等に応じて、通常、酸度が $1.0 \sim 4.0\%$ となるような割合で混合することができる。

#### 【0013】

前記チーズホエーは、通常チーズ製造時等におけるレンネットによってカード凝固させた後に、該カードを常法に従ってホエー分を分離することにより得られる。この際、レンネットによる処理前の乳は、高温加熱殺菌等が施されていても良い。

#### 【0014】

本発明の肝障害予防又は抑制剤の有効成分としてのホエーの投与量は、投与の継続性等により適宜選択でき特に限定されないが、通常、凍結乾燥粉末として $0.001\text{g}/\text{体重kg}/\text{日以上}$ 、好ましくは $0.01\text{g}/\text{体重kg}/\text{日以上}$ である。また、本発明の肝障害予防又は抑制剤には、必要によりホエー以外の肝障害予防又は抑制作用を有する他の成分を含有させることも可能である。

本発明の肝障害予防又は抑制剤の形態は、ホエーそのまま、若しくはその処理物として、例えば、ホエーを減圧濃縮等で濃縮した濃縮物として、また、ホエーを凍結乾燥、噴霧乾燥等の乾燥処理を行なって、乾燥した粉末の形態とすることもできる。

本発明の肝障害予防又は抑制剤の投与は、通常、経口投与で行なうことができ、例えば、肝障害が生じる前に継続的若しくは断続的に、更には、肝障害が生じた後に、継続的又は断続的に摂取することができる。

#### 【0015】

本発明の肝障害予防又は抑制用機能性食品は、前記肝障害予防又は抑制剤を含む。

前記機能性食品としては、肝細胞壊死等の肝障害の予防や抑制を訴求した特定保健用食品等の食品が挙げられる。

前記機能性食品には、糖類、タンパク質、脂質、ビタミン、ミネラル、フレーバー、またはこれらの混合物等の添加物を添加することもできる。また、ホエーを分離する前のホエー以外の乳成分を更に含んでも良い。

本発明の機能性食品において、前記有効成分としてのホエーの配合割合は、食品の形態や種類に応じて適宜選択することができ、その機能性食品の摂取継続性等に応じて適宜選択することができ特に限定されないが、通常1～100質量%の範囲が適当である。

前記機能性食品の形態としては、例えば、ヨーグルト、乳酸菌飲料等の発酵乳製品、ホエー配合加工飲食品、乾燥粉末、錠剤、カプセル剤、顆粒剤等が挙げられる。

#### 【0016】

本発明の機能性食品は、投与量及び投与時期は特に限定されないが、前記有効成分の投与量程度で摂取することが好ましく、例えば、肝障害が生じる前に継続的若しくは断続的に、更には、肝障害が生じた後に、継続的又は断続的に摂取することが好ましい。

#### 【実施例】

##### 【0017】

以下実施例により、更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

##### 実施例1及び2

市販の脱脂粉乳を固形率9質量%となるように蒸留水で溶解し、オートクレーブで105℃、10分間、高温加熱殺菌した後、室温まで冷却し、ラクトバチラス・ヘルペティカスCM4株のスターターを3質量%接種し、37℃、24時間培養を行って発酵乳を得た。この発酵乳を12000G、20分間遠心分離して固形分を除去し発酵ホエーを調製した。

また、市販の脱脂粉乳を固形率9質量%となるように蒸留水で溶解し、オートクレーブで105℃、10分間、高温加熱殺菌した後、室温まで冷却し、乳酸を酸度が2.2%となるように加えた。次いで、12000G、20分間遠心分離して固形分を除去することによりカゼインホエーを調製した。

得られた発酵ホエー(実施例1)又はカゼインホエー(実施例2)を蒸留水で10質量%になるよう希釈し、飲水として以下の動物試験に供した。また、コントロールとしてホエーを含まない蒸留水の対照区についても試験を行なった。

##### 【0018】

3週齢のICR系雄性マウスを3群(10匹/1群)に分け、固型飼料(商品名「MF」、オリエンタル酵母工業(株)製)と、蒸留水、上記で調製した10質量%発酵ホエー、又は上記で調製した10質量%カゼインホエーをそれぞれ1ヶ月間自由摂取させた。次いで、18時間絶食させた後、各群をさらに5匹づつに分け、生理食塩水又はアセトアミノフェン溶液(700mg/kg)を腹腔内投与した。このアセトアミノフェンは、解熱鎮痛剤として一般の医薬品にも使用されているが、大量に摂取すると肝臓で処理できず、劇症肝炎様の肝障害を引き起こすことが知られており、肝障害の実験における評価によく使用されている。

投与後、2時間目と4時間目に、トランスアミラーゼCIIテストキット(ワコー社製)を使用して血清中のGOT値及びGPT値を測定することで、肝障害予防又は抑制作用を評価した。結果を表1に示す。

表1の結果より、コントロールの蒸留水投与群は、血清中のGOT値及びGPT値がアセトアミノフェン投与により顕著に上昇するが、発酵ホエー投与群及びカゼインホエー投与群ではこのような上昇が抑制され、優れた肝障害予防又は抑制作用を示すことが判った。特に、発酵ホエー投与群では、カゼインホエー投与群に対してもアセトアミノフェン投与によるGOT値及びGPT値の上昇が抑制されることがわかった。

##### 【0019】



【表 1】

			2時間目の値	4時間目の値
G O T 値	コントロール	水＋生理食塩水投与群	1 6 4	1 9 8
		水＋アセトアミノフェン投与群	5 7 7	8 4 1
	実施例 1	発酵ホエー＋生理食塩水投与群	8 3. 9	5 9
		発酵ホエー＋アセトアミノフェン投与群	1 2 5	2 2 9
	実施例 2	カゼインホエー＋生理食塩水投与群	1 2 3	2 1 2
		カゼインホエー＋アセトアミノフェン投与群	3 4 0	7 9 8
G P T 値	コントロール	水＋生理食塩水投与群	1 1. 8	2 8. 4
		水＋アセトアミノフェン投与群	1 2 8	6 1 8
	実施例 1	発酵ホエー＋生理食塩水投与群	6. 2 9	1 5. 8
		発酵ホエー＋アセトアミノフェン投与群	6. 0 2	3 0. 1
	実施例 2	カゼインホエー＋生理食塩水投与群	1 4. 6	2 0. 5
		カゼインホエー＋アセトアミノフェン投与群	4 0. 5	1 1 0

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 日常的に連用可能で、安全性に優れ、肝細胞壊死等の肝障害を有効に予防又は抑制しうる肝障害予防又は抑制剤及び、該剤を含む肝障害予防又は抑制用の特定保健用食品等の機能性食品を提供すること。

【解決手段】 本発明の肝障害予防又は抑制剤は、ホエーを有効成分として含み、本発明の肝障害予防又は抑制用機能性食品は、前記肝障害予防又は抑制剤を含む。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 1 0 6 1 0 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 1 0 4 3 5 3 ]

1. 変更年月日 1 9 9 7 年 9 月 1 日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 東京都渋谷区恵比寿西 2 丁目 2 0 番 3 号  
氏 名 カルピス株式会社
2. 変更年月日 2 0 0 4 年 8 月 2 5 日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 東京都渋谷区恵比寿南二丁目 4 番 1 号  
氏 名 カルピス株式会社